

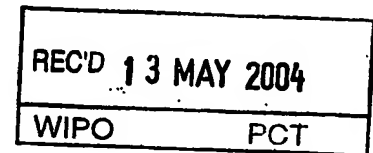
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 3 1 7 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 3 1 7 3]



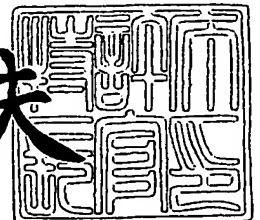
出 願 人 株式会社レノメディクス研究所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 4 9 4 9

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0824
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南 2 2 条西 1 4 丁目 1 - 2 5 - 3 0 2
【氏名】 小船 雅義

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区宮ヶ丘 2 - 1 - 3 0 - 6 0 2
【氏名】 濱田 洋文

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北 3 条西 3 0 丁目 2 - 1 - 9 0 1
【氏名】 新津 洋司郎

【特許出願人】
【識別番号】 502455393
【氏名又は名称】 株式会社 レノメディクス研究所

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を用いて該ポリペプチドを発現させることを含む造血系細胞増殖方法。

(a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド

(b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28～202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号 1 で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号 1 で表される配列中 28～202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて 1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

【請求項 2】

次の (a)、(b) 又は (c) の DNA からなる遺伝子を発現させることを含む造血系細胞増殖方法。

(a) 配列番号 2 で表される DNA

(b) 配列番号 2 で表される DNA 配列において 81～606 番目の塩基を少なくとも含む DNA

(c) 上記 (a) 又は (b) の DNA と緊縮条件下で、ハイブリダイズし、かつインディアンホッグ活性を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 3】

次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が導入された骨髓ストローマ細胞。

(a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド

(b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28～202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号 1 で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号 1 で表される配列中 28～202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて、1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

【請求項 4】

骨髓ストローマ細胞が、hTERT (ヒトテロメラーゼ触媒ドメイン) 遺伝子が既に導入されたストローマ細胞である請求項 3 記載の骨髓ストローマ細胞。

【請求項 5】

造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がレトロウイルスベクターを用いて導入された請求項 3 又は 4 記載の骨髓ストローマ細胞。

【請求項 6】

請求項 3～5 記載いずれか 1 項記載の骨髓ストローマ細胞を造血系細胞と共培養することを含む造血系細胞増殖方法。

【請求項 7】

造血系細胞が、臍帯血由来の CD34 陽性細胞である請求項 6 項記載の方法。

【請求項 8】

共培養を、サイトカインの存在下で行う請求項 6 又は 7 記載の方法。

【請求項 9】

共培養を 2～4 週間行う請求項 6～8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

請求項 3～5 いずれか 1 項記載の骨髓ストローマ細胞と造血系細胞を含む人工骨髓。

【請求項 11】

次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む造血作用増強用発現ベクター。

- (a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド
- (b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28～202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド
- (c) 配列番号 1 で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド
- (d) 配列番号 1 で表される配列中 28～202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて 1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

【請求項 12】

次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドを有効成分として含む造血系細胞用増殖剤。

- (a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド
- (b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28～202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド
- (c) 配列番号 1 で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド
- (d) 配列番号 1 で表される配列中 28～202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて 1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

【請求項 13】

造血系細胞がヒト造血細胞又はヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞である請求項 12 記載の増殖剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】インディアン ヘッジホッグ遺伝子導入によるヒト不死化骨髓ストローマ細胞の造血支持能の増強方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、造血系細胞の増殖に係る技術分野に属する。本発明は、特に、ヒト造血幹細胞又は臍帯血由来のCD34陽性細胞の増殖の技術分野、更に、具体的には、ヒト不死化骨髓ストローマ細胞の造血支持能の増強方法の技術分野に属する。

【背景技術】

【0002】

近年、ヒト造血幹細胞を用いた再生医療が注目され、骨髓移植のみならず血管、心筋、肝臓などの組織再生に利用しうる可能性が示唆されている。しかしながら造血細胞中に含まれる造血幹細胞は極めて低頻度であることが、幅広い臨床応用に向けての妨げの一因となっており、多量の造血幹細胞を組織再生に利用できれば、効果的な治療法の開発につながる事が期待される。これまで過去10年以上にわたり、造血幹細胞を体外で増幅させようとする多数の試みがなされてきた。それらの知見より、造血幹細胞の自己複製能と多分化能を維持する上でストローマ細胞（骨髓間質細胞）の機能が重要な役割を演ずることが明らかにされた。

【0003】

例えば、マウス、ブタおよび猿の骨髓間質細胞を用いて造血幹細胞を増幅しようとする試みがなされてきた。しかしながら、異種動物のストローマ細胞を用いた場合には、異種の抗原が混入するリスクがあり、臨床応用は容易ではなかった。

【0004】

最近、初代ヒト・ストローマ細胞を用いることで、無血清培地下でヒト造血前駆細胞が増幅可能であることが報告された。しかしながら、初代ヒト・ストローマ細胞は長期継代が困難で、約20継代で増殖が停止し、老化してしまうといった問題点があった（非特許文献1）。

【0005】

発明者等は、既に、初代ヒト・ストローマ細胞は長期継代するため、ヒト骨髓ストローマ細胞に対して様々な不死化法を試みた結果、テロメラーゼ遺伝子（hTERT）を発現するレトロウイルスベクターを導入するのみで約100継代・500日以上にわたって腫瘍化することなく長期培養可能であることを明らかにした。さらにhTERTストローマとヒト臍帯血由来CD34陽性細胞と共培養することで、CD34陽性の造血前駆細胞を2週間で約500倍に増幅可能であり、その後もストローマに落ち込んだ造血細胞から毎週約500倍の造血前駆細胞が産生できることを明らかにした（特許文献1）。

【0006】

ところで、胎生期には造血幹細胞が出現し、出生までに急激に増幅することが知られている。最近、その分子メカニズムの一部が明らかにされてきた。Dyer-MAらはインディアン ヘッジホッグが胎生期の原始外胚葉に作用すると、造血および血管新生が誘導されることを報告した（非特許文献2）。また、胎生期の神経分化に係わるソニック・ヘッジホッグがCD34陽性造血幹細胞を増幅することを報告されている（非特許文献3）。

【0007】

なお、ヘッジホッグ遺伝子ファミリーは、細胞内シグナルとして働く分泌性タンパク質のクラスをコードしており、脊椎動物では、ヘッジホッグ遺伝子としては、ソニック（sonic）、インディアン（indian）、及びデザート（desert）が知られている。ヘッジホッグ遺伝子は、進化上保存されており、種々の動物で、正常な成長及びパターンニングを制御している。脊椎動物では、ヘッジホッグ遺伝子ホモログは、組織特異的に発現し、神経管、骨格など種々の器官の形態形成に重要な役割を負っている。当該タンパク質の活性シグナル（伝達）型は全長のHhの自己分解中にコレステロールに結合され、この修飾が当該タンパク質の組織内での濃度勾配を形成させ、組織の立体構築に関与している。

【0008】

【特許文献1】WO03/038076号公報

【非特許文献1】Experimental Hematology 29, 174-182

【非特許文献2】Development. 2002;129:361-372

【非特許文献3】Mech Dev. 2001;106:107-117

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

発明者等の樹立したhTERTストローマ細胞は凍結保存しても造血支持能が維持され、かつドナーによらずに樹立可能であることから、自己ストローマ細胞を用いて自己の造血前駆・幹細胞を必要とときに増幅することが可能となった。

【0010】

しかしながらhTERTストローマ細胞は、4週以上の長期にわたり造血幹細胞の機能を維持可能である反面、幹細胞の増幅率はマウスのものと比較して低率であることが明らかとなり、造血幹細胞を増幅するための何らかの工夫が必要と考えられた。

【課題を解決するための手段】

【0011】

そこで本発明者等は、hTERTストローマ細胞にレトロウイルスベクター用インディアンヘッジホッグ（以下ihhとも呼ぶ）遺伝子を導入することで、インディアンヘッジホッグを過剰発現するhTERTストローマ細胞(indian hedgehog/hTERTストローマ)を樹立し、そのストローマ細胞をヒトCD34陽性細胞と共培養したところ、コントロールのストローマと比較しCD34陽性細胞を3.6倍、CFU-mix (Colony-Forming Units mixed cells、幼若コロニー形成細胞)を5.5倍、HPP-CFC (Highly Proliferative Potential-Colony Forming Cell、高増殖能維持コロニー形成細胞)を8.9倍以上に増幅し、かつ増幅された血球は強力骨髄再建することを見出し、本発明を完成させたものである。

【発明の効果】

【0012】

ihh遺伝子をヒト骨髄ストローマ細胞に遺伝子導入することで、ihhを過剰発現させると、その直接作用および間接作用を介して、造血支持能を増強することができる。

【0013】

さらに、本発明で得られた造血支持能が強力なihh発現自己ストローマ細胞を用いることで、自己造血幹細胞を増幅する新たな技術を開発できるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本件発明は、(1)ヘッジホッグ遺伝子、好適には、インディアンヘッジホッグ遺伝子を用いた造血系細胞の増殖方法。(2)ヘッジホッグ、好適には、インディアンヘッジホッグからなる造血系細胞増殖因子を有効成分とする造血系細胞用増殖剤。(3)ストローマ細胞にヘッジホッグ遺伝子を導入することで、ヘッジホッグを過剰発現させたストローマ細胞及びその調製方法、好適には、既にhTERT導入された骨髄ストローマ細胞にインディアンヘッジホッグ遺伝子を導入することで、インディアンヘッジホッグを過剰発現させた骨髄ストローマ細胞及びその調製方法、並びに(4)該ストローマ細胞をヒトCD34陽性細胞等の造血系細胞と共培養することによるヒトストローマ細胞の造血支持能の増強方法を提供する。

【0015】

インディアンヘッジホッグは液性因子としてのみならず、N末およびC末の脂質修飾を介し膜結合性因子としても作用することから、ストローマに接着して増殖する造血幹細胞分化の支持能を増強すると考えられる。

【0016】

インディアンヘッジホッグ（以下ihhと略することがある。）は、全長411アミノ酸からなるポリペプチドとして合成されるが、1~27アミノ酸は、蛋白分泌のためのsigna

l peptideで、203～411アミノ酸は細胞外に分泌されるまでに切断される。したがって体内で機能している ihh は、28～202アミノ酸からなっている。

【0017】

本発明で使用する ihh としては、例えば(a)配列番号1で表されるインディアン ヘッジホッグを用いることができる。更に、(b)配列番号1で表される配列において少なくとも28～202のアミノ酸残基を含むポリペプチド、(c)配列番号1で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド、及び(d)配列番号1で表される配列中28～202のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0018】

インディアン ヘッジホッグ遺伝子（以下 ihh と略することがある。）としては、例えば、以下の (a) ～ (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がある。

(a)配列番号1で表されるインディアン ヘッジホッグ、(b)配列番号1で表される配列において少なくとも28～202のアミノ酸残基を含むポリペプチド、(c)配列番号1で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド、及び(d)配列番号1で表される配列中28～202のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド。

【0019】

更に、具体的には、以下のDNAからなるインディアン ヘッジホッグ遺伝子には、以下を包含する。

- (a)配列番号2で表されるDNA
- (b)配列番号2で表されるDNA配列において81～606番目の塩基を少なくとも含むDNA
- (c)上記 (a) 又は (b) のDNAと緊縮条件下で、ハイブリダイズし、かつインディアンヘッジホッグ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0020】

なお、緊縮条件下とは、例えばナトリウム濃度が、20～100mMであり、42℃～55℃での条件をいう[Molecular Cloning (Sambrookら編集(1989)Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)]。

【0021】

なおインディアン ヘッジホッグの造血系細胞増殖活性は、例えば、下記する本発明の実施例5におけるように、ihhを導入したストローマ細胞が造血細胞（HPC）を増幅するか増幅率で計測できる。

【0022】

ストローマ細胞内でインディアン ヘッジホッグ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることができる。また、インディアン ヘッジホッグを、適切な緩衝液に溶解して用いて、直接造血系細胞とストローマ細胞の共培養物に添加することもできる。

【0023】

ストローマ細胞の由来としては、哺乳動物のストローマ細胞、特にヒト由来のストローマ細胞が好適である。ストローマ細胞には、骨髓由来の初代ストローマ細胞、経代されたストローマ細胞及び遺伝子改変されたストローマ細胞が包含されるが、好適には、WO 03/038076号公報に記載のhTERT遺伝子が導入されたヒト骨髓ストローマ細胞（以下hTERTストローマ細胞という）を用いることができる。なお、hTERTの配列は、例えば、Science 277, p.955-959に記載されている。

【0024】

hTERTストローマ細胞は、例えば、次のようにして調製できる。
pCI-Neo-hTERT-HAよりPCRにて得たhTERT EcoRV-SalI fragmentをpBABE-hygroにcloningしpBABE-hygro-hTERTを調製する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol95, p14723-14728)。次に、BOSC23パッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8392-8396, 1993)を用いて、 Ψ CRIPパッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543, 1993)を作成する。上記のベクターを、レトロウイルス産生細胞 (ϕ CRIP/P131) で増殖させる。

【0025】

そして、感染を行う前日に、ストローマ細胞を播きなおし、レトロウイルスを産生する ϕ CRIP/P131の培地を代えて培養する。次に上清に産生された組み換えレトロウイルスベクターをストローマ細胞 (stromal cell) に感染させた。4時間後培養上清を新しい培地に換えてさらに2日間培養した。その後、pBABE-hygro-hTERTはハイグロマイシン100 μ g/mlで5日間、薬剤選択を行ってhTERTストローマ細胞を調製することができる。

【0026】

ストローマ細胞に導入するインディアン ヘッジホッグ遺伝子は、好適には、ヒトのインディアン ヘッジホッグ遺伝子である。具体的には、配列番号2の遺伝子を用いることができる。

【0027】

インディアン ヘッジホッグ遺伝子をストローマ細胞に導入するための方法としては、種々の遺伝子導入方法を用いることができるが、リポフェクション法は不適切で、好適には種々のベクターを用いることができ、好適には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、特に好適にはレトロウイルスベクターを用いることができる。好適には、pRx-IRES-neo (Hum Gene Ther. 1998;9:1983-1993)を用いることができる。

【0028】

hTERT導入した骨髓ストローマ細胞にインディアン ヘッジホッグ遺伝子を導入した骨髓ストローマ細胞 (ihhストローマ細胞と略すことがある。)を更に、造血系細胞と共培養して、造血系細胞を増幅することができる。

【0029】

造血系細胞としては、臍帯血由来のCD34陽性細胞 (CB34+と略すこともある。)、造血細胞 (例えば、CB34+細胞とストローマ細胞とを共培養することにより分離できる、HPCs: Hematopoietic cells)、造血幹細胞HSC (Hematopoietic stem cell, ヒト造血幹細胞)、造血前駆細胞、Tリンパ球、及びBリンパ球を包含する。

【0030】

造血系細胞と本願発明のストローマ細胞との共培養には、サイトカイン類を共存させることができ、例えば、共存させるサイトカインとしては、可溶性のSCF (kitリガンド)、flt3リガンド、トロンボポエチン (TPO)等を挙げることができ、具体的には、TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)及びSCF (10ng/ml)を共存させることができる。共培養は、例えば、2-4週間行うことができる。

【実施例】

【0031】

【参考例1】

初代ストローマ細胞、間葉系幹細胞におけるヘッジホッグ関連遺伝子の発現およびサイトカイン遺伝子の発現

インディアン ヘッジホッグ (ihh)は、胎生期のヨーク・サックの造血のみならず軟骨細胞からも分泌され骨端形成に重要な役割を果たすことが知られている。近年、軟骨細胞は骨髓間質幹細胞から分化してくることが示された。このことより、我々はihhが骨髓間質細胞で発現している可能性を想定し、間葉系幹細胞、ストローマ細胞、造血細胞 (臍帯血) およびHUVEC (血管内皮細胞)におけるヘッジホッグおよびそのレセプター分子の発現

を、RT-PCRを用い、スクリーニングした。

【0032】

具体的には、Total RNAは QIAGEN RNeasy キット (Qiagen) で精製し、RT反応はスーパースク립トTM II逆転写酵素を用いた (Invitrogen, Tokyo, Japan)。得られたPCR反応はAccuTaq LAポリメラーゼミックス (シグマ) を用いて行った。94℃ (denaturation) 3分、94℃ (denaturation) 30秒、56℃ (annealing) 30秒、72℃ (extention) 60秒で35サイクル増幅した。表1に用いたprimerを示した。PCR産物は2%のアガロース・ゲルで電気泳動分離し、エチジウム・ブロマイドで染色し可視化した。

【0033】

【表 1】

表 1 使用されたプライマー

	センス	アンチセンス
lhh-C	5'-CTTCCGGGCCACATTGGCCAGCCA-3'	5'-GAGACGCCCCAGGCGGTAGAGCA-3'
lhh-N	5'-TGCGGGCCGGTCCGGTGGTG-3'	5'-GCCGCCCGTCTTGGCTGC-3'
Shh-1	5'-TACAACCCCGACATCATATTTAAGG-3'	5'-CGTCTCGATCACGTAGAGACCTTC-3'
Shh-2	5'-CACCTGGAGCGGTTAGGGCTACTCT-3'	5'-GCCCCAGGGCACCAATTCTCATCAAC-3'
Ptc1	5'-CTGTTGGCATAGGAGTGGAGTTCACCC-3'	5'-CTGCTGGGCCCTCGTAGTGCCGAAGC-3'
Smo	5'-CAGAACATCAAGTTCAACAGTTCAGGC-3'	5'-ATAGGTGAGGACCACAAACCAACCACACC-3'
Ang1	5'-GGTCACACTGGGACAGCA-3'	5'-CGTAAGGAGTAAC TGGGC-3'
BMP4	5'-GCCAAGCGTAGCCCTAAGCATCACTCA-3'	5'-CAATGGCATGGTTGGTTGAGTTGAGGT-3'
β -actin	5'-GCTCGTCGTCGACAAACGGCTC-3'	5'-CAAACATGATCTGGGTCACTCTTCTC-3'

【0034】

(結果)

その結果、ihhは骨髄間葉系幹細胞およびストローマ細胞のいずれでもmRNAの発現を検出し得た。興味深いことに、血球細胞である臍帯血でihhが高度に発現していた。さらに、間葉系幹細胞およびストローマ細胞のいずれでもihhのレセプター分子であるPatched(P_{TC})およびシグナル伝達分子であるsmoothened(SMO)の発現を認め(図1A)、このことはBhardwajらの報告と一致していた(Nat Immunol. 2001;2:172-180)。

【0035】

また、造血幹細胞を増幅させることが報告されているソニック・ヘッジホッグ(SHH)の発現を検討してみたが、HUVEC(血管内皮細胞)および胸腺組織(陽性コントロール)ではmRNAの発現が検出されるものの、骨髄間質細胞における発現は検出感度以下であった(図1B)。

【0036】

以上のことより、我々はihhが骨髄微細環境で何らかの役割を演じている可能性を推定した。さらに、CD34陽性細胞におけるmRNAの発現を検討してみたところ、未分化造血細胞であるCD34陽性分画(純度95%)では、ihhは検出され、またシグナル伝達分子であるSMOの発現を認めたことから(図1C)、ihhは未分化な造血細胞に対して、働く可能性が示唆された。

【0037】

[参考例2]

抗ヘッジホッグ中和抗体5E1の調整

Hybridoma 5E1はIOWA Developmental studiesハイブリドーマ・バンクから購入した。ハイブリドーマは10%FBS含IMDM、2 mM glutamin、1%P/S (50 U/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin) で培養した。ハイブリドーマ接種の1週前にBalb Cマウスの腹腔内に1 mlのpristaneを投与した。対数増殖期にあるハイブリドーマ細胞はオートクレイブ滅菌したPBSで2回洗浄した後、 2.5×10^6 細胞/mlに調整した。22G針を使って、 5×10^6 個細胞を腹腔内に投与した。その後、腹水が形成されるまで10日間マウスを放置した。腹水からのモノクローナル・抗体5E1(IgG1)の精製はプロテインGカラム(ImmunoPure(R) PIERCE)を用いて行った。pH5.0のバッファ(ImmunoPure(R) PIERCE)で洗浄した後、pH2.8のバッファ(ImmunoPure(R) PIERCE)でエリューションした直後に、1Mリン酸塩バッファpH7.5で中和した。IgGの量(mg/ml)は、A280/14x10で算出した。

【0038】

[実施例1] インディアン ヘッジホッグ遺伝子導入hTERTストローマ細胞(以下ihh-ストローマ細胞という)の調製

1. ヒト骨髄ストローマ細胞の培養

ヒトの骨髄細胞はインフォームド・コンセントの後に健康成人ボランティアの後腸骨稜から穿刺して得た。骨髄単核細胞(MNCs)を150-cm²プラスチック・ディッシュにいれ、一昼夜培養した。非付着細胞を洗浄除去した後に、付着細胞を骨髄初代ストローマ細胞として用いた。hTERTストローマ細胞は、上に摘示したWO03/038076号公報に記載の方法で調整した。hTERT-ストローマ細胞を用いることで遺伝子導入ストローマ細胞株を樹立した。これらのヒト・ストローマ細胞はMinimal essential medium- α に、12.5%の馬血清(Gibco BRL, Rockville, MD, USA)、12.5%の胎児牛血清(Gibco BRL)、 1×10^{-6} M hydrocortisone (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA) および 1×10^{-4} β -mercaptoethanol (Sigma Chemical Corp) を添加した(LTC)培地で5%CO₂、37°Cで培養した。間葉系幹細胞の培養は、上記のプラスチック・ディッシュに付着した細胞を、非動化した胎児牛血清(Gibco BRL, Rockville, MD, USA)を添加したDulbecco modified essential medium (DMEM)で培養した。

【0039】

2. Retroviral vectorと遺伝子導入

バイシストロニックなレトロウイルス・ベクターpRx-IRES-hrGFPを作成するために、pRx-

IRES-neo4のneomycin resistant geneを、phrGFP-C plasmid (Stratagene, La Jolla, CA) 由来のhrGFP (humanized Renillareniformis green fluorescent protein) (~717 bp) に置き換えた。DH5 α コンピテント細胞 (Life Technologies, Grand Island, NY) に形質転換後、pRx-ires-hrGFPを含んでいるコロニーはmini-preparation (Bio Rad, Hercules, CA) した後に制限酵素消化によって確認することで得た。

【0040】

Indian Hedgehog (ihh)のN末が、その全活性の発揮し、C末は活性を持たないことが報告されている。ihhのN末 (ihh-N, 1-202) cDNAの合成は、帯血由来のRNAを鋳型として逆転写反応をoligo-dTをプライマーとして施行した。Polymerase chain reaction(PCR) は以下のプライマーを用いて行った。

5' -AGGATCCACCATGTCTCCCGCCCGGCTCCGCCCCGACTGCACTTC-3' および 5' -GAGCGCCGCTTACCGCCCGTCTTGGCTGCGGCCGAGTG-3'。

【0041】

センス・プライマーにはBamHIをアンチセンス・プライマーにはNotIサイト挿入した。アガロースゲル電気泳動後にPCR産物を精製し、クローニングベクターであるpGEM-T easyにライゲーションした (Life Technologies, Grand Island, NY)。DH5 α を形質転換した後、ihh cDNAを含んでいるコロニーは制限酵素消化によって同定した。DNAのシーケンス決定し、得られたihh-Nに問題が無いことを確認した。

【0042】

pRx-IHH-IRES-hrGFPレトロウイルスベクターを作成するために、pGEM-T easyからihh-N末のcDNAを制限酵素BamHIとNotI (New England Biolabs, Beverly, MA) の二重消化で切り出し精製した。これをpRx-IRES-hrGFPのBamHIとNotIにライゲーションした。DH5 α を転換した後に、pRx-IHH-IRES-hrGFPを含んでいるコロニーを制限酵素 (endonuclease) 消化によって同定した (図2 (A))。

【0043】

3. 組み換えレトロウイルスベクター産生細胞の作製

(1) Phoenix-AMPHO細胞を10cm dishにトランスフェクションの18~24時間前に 5.5×10^6 個播いた。

(2) 15 μ gの上記の2種のレトロウイルス・ベクターpRx-IRES-hrGFPあるいはpRx-IHH-IRES-hrGFPに、OPTI-MEM (Gibco/BRL) を800 μ l静かに加え、攪拌しA液を調製した。

(3) 滅菌されたチューブにOPTI-MEMを750 μ l採り、LIPOFECTAMINE (2 mg/ml Gibco/BRL) を50 μ l加えてゆっくり混ぜB液を調製した。

(4) A液を静かにB液に混ぜC液を調製し、室温で30~45分放置した。

(5) Phoenix-AMPHO細胞を抗生剤、FBSを除いた37℃の培地で1度洗った。

(6) C液 (1.6 ml) を静かにPhoenix-AMPHO細胞に加えた。

(7) 更に、2.4 mlのOPTI-MEMを加えた。

(8) 5時間、5%CO₂下でインキュベートした。

(9) 4 mlの20%胎児ウシ血清を含むDMEMを加え、1晩インキュベートした。

(10) 24時間後、Phoenix-AMPHO細胞の培地を0.45 μ mのシリンジフィルターで濾過し、Phoenix-AMPHOの培地を5 mlの濾過した培地に交換した。同時にポリブレン (Hexadimethrine Bromide, SIGMA H-9268) を8 μ g/mlになるように加え-80℃に凍結保存した。

【0044】

4. 骨髄ストローマ細胞へのトランスフェクション

次に、上記の2種のレトロウイルス・ベクターを骨髄ストローマ細胞にトランスフェクション (transfection) した (pRx-IHH-IRES-hrGFPを導入したhTERTストローマ細胞は、実施例1で調製したihh-ストローマ細胞と呼ぶ)。

【0045】

まず、トランスフェクションを行う前日に、hTERTストローマ細胞を 5×10^4 cell/10 cm dishとなるように播きなおし、当日に、凍結保存した上清を37℃の恒温槽で溶解させ、組み換えレトロウイルスベクターを骨髄ストローマ細胞 (stromal cell) に感染させた。4

時間後培養上清を新しい培地に換えてさらに2日間培養した(図2(B))。

【0046】

GFP陽性ストローマ細胞をFACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いることで、5万個の細胞をソーティングした。ソーティング後のGFP陽性細胞の純度はコントロール・ストローマ細胞(pRx-IRES-hrGFPを導入したhTERT-ストローマ細胞を以下の実施例中でもコントロール・ストローマ細胞と呼ぶ。)及びihh-ストローマ細胞で、それぞれ96.7%および93.3%であった。

【0047】

[実施例2]

ihh遺伝子導入ストローマ細胞の表面抗原および遺伝子発現の確認

(1) 実施例1で得られたihh発現細胞において、ストローマ抗原の発現が維持されているか否か(ref)、SH2 (CD105, endoglin)およびSH3(CD73)の発現、およびGFP陽性率を検討した。

【0048】

ストローマ細胞の表面抗原をフローサイトメトリーを用い解析した。細胞を0.1%牛血清アルブミン(BSA)含PBSで、2回洗浄した後、 5×10^5 細胞を抗CD73 (SH3) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA)あるいは抗CD105 (SH2) (Immunotech, Marseille, France)抗体で30分の間、4°Cでラベルした。二次抗体としてR-phycoerythrin (PRE) F(ab')₂を用いた。細胞はEPICS XL flowcytometerを用い解析した。死細胞は前方散乱および側方散乱でゲートを掛け除外した。

【0049】

GFPの発現率はコントロールおよびihh-ストローマ共に90%以上の純度であり、またGFP陽性細胞ではSH2およびSH3などのストローマの抗原の発現が保たれていた(図2(C))。

【0050】

[実施例3]

ihh遺伝子導入ストローマ細胞の遺伝子発現の確認

(1) hTERTストローマ細胞におけるヘッジホッグ遺伝子の発現はRT-PCRを用い解析した。Total RNAはQIAGEN RNeasy キット(Qiagen)で精製し、RT反応はスーパースクリプト™II逆転写酵素を用い行った(Invitrogen, Tokyo, Japan)。得られたPCR反応はAccuTaq LAポリメラーゼミックス(シグマ)を用いて行った。94°C (denaturation) 3分、94°C (denaturation) 30秒、56°C (annealing) 30秒、72°C (extension) 60秒で35サイクル増幅した。表1に用いたprimerを示した。PCR産物は2%のアガロース・ゲルで電気泳動分離し、エチジウム・ブロマイドで染色し可視化した。

【0051】

(2) 実施例1で調製したihh-ストローマ細胞におけるihh-Nの蛋白発現はimmunoblotで解析した。ihh-ストローマ細胞の培養上清10 µlを4/25%のSDS-polyacrylamide濃度勾配ゲルで分離し、そしてセミドライ・トランス・プロット(Bio-Rad)でPVDFメンブレンに転写した。抗ihh抗体(5E1; IOWA hybridoma bank)でヘッジホッグ・タンパクをラベルした。ラベルされた蛋白はECL (Amersham Pharmacia)で検出した。

【0052】

(結果)

RT-PCRは、ihhのN末側を検出するprimerを用いて行った。コントロールのストローマではihh-Nは検出感度以下であったが(C末は検出可能)、ihh-ストローマ細胞ではihh-Nが容易に検出できた(図2、(D))。

【0053】

次に、ストローマの培養上清へのihh-Nの分泌を、western blot法で検討した。ストローマの上清は、PBSで3回洗浄した後、無血清培地X-VIVO10に置き換え、72時間培養後に得た。抗体はヘッジホッグ・モノクローナル抗体5E1を用いた。コントロール・ストローマの上清ではihh-Nは検出感度以下であったが、ihh-ストローマ細胞の上清ではihhが検出できた(図2(E))。

【0054】

[実施例 4]

臍帯血CD34陽性細胞とストローマ細胞の共培養

4万個のコントロールおよび実施例1で調製したihh-ストローマ細胞を25 cm² flaskに播いた。サブコンフルエントになった時点で、PBSで3回洗浄を繰り返すことにより、ストローマ培地に含まれていた血清を取り除いた。そして、X-VIVO10 with TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml)を添加し、あらかじめX-VIVO10 (TPO(50ng/ml)、FL(50ng/ml)、SCF(10ng/ml)含有) にいれてある5 x 10³ CD34+臍帯血細胞を加えた。こうして、CD34+臍帯血の存在下ベクターにより遺伝子導入したストローマ細胞と2週間共培養した。培養上清を回収し、2x10³細胞をコロニーアッセイに用いた。2週間後にコロニーをカウントした。また、共培養時にヘッジホッグを中和する目的で500のμgの5E1を3日ごとに共培養システムの中に添加した。ストローマ細胞の上に増幅された造血細胞を回収し、フローサイトメトリーおよびコロニーアッセイで解析した。コロニーアッセイはMethoCult GF H4434V (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)を用いて行ない、14日間培養後コロニー数を顕微鏡下でカウントした。

【0055】

(結果)

ストローマ細胞と共培養して得られた細胞を、フローサイトメトリーで解析した。コントロールのストローマで増幅した細胞のCD34陽性率は22%から27%であったが、ihhを高発現させたストローマ細胞で増幅したCD34陽性率は、31%から35%と高度に保たれていた。増幅した造血細胞の分化抗原を検討したところ、CD3、CD19などのリンパ球抗原、GPAおよびCD41のような赤芽球および巨核球抗原の発現率に差を認めなかった。しかしながら、顆粒球系抗原であるCD11bに関しては、コントロールのストローマで増幅した造血細胞の陽性率は45%前後と高率であったが、ihhを高発現させたストローマ細胞で増幅した場合には、30%以下に抑えられていた。このことよりihhストローマでは、コントロール・ストローマに比較して、顆粒球系への分化が抑制され、未分化なCD34陽性細胞分画が保たれる可能性が示唆された。(図3)

【0056】

次に、コロニーアッセイにより、未分化造血細胞が支持されているか否か検討した(表2)。ihhストローマで増幅させ得られた造血細胞の総細胞数、総CD34、CFU-C(Colony Forming Unit in Culture、)、CFU-mix (Colony-Forming Units mixed cells、幼弱コロニー形成細胞) およびHPP-CFC数は、コントロール・ストローマで増幅したものよりも有意に高値を示していた。また、コントロールとの差を見ると、CFU-mixおよびHPP-CFCなどのより幼若なコロニー形成能のある造血前駆細胞でその差が顕著であった。

【0057】

【表 2】

表 2. 2週間の臍帯血CD34陽性細胞 (CB CD34+) *Ex vivo* での増幅

	ストローマ細胞なし	コントロールストローマ細胞	lhh導入ストローマ細胞
総細胞数	76±36	490±38	635±30 **
CD34+細胞数	5±2	26±2	95±6 **
CFC	2±1	26±2	59±3 **
CFU-Mix	8±7	63±37	349±116 *
HPP-CFC	12±11	200±175	1784±1555 *

数値は、当初の細胞数に対する増加倍数を示す。for lhh-stroma vs. control stroma. * $P<0.05$; ** $P<0.01$. 結果は平均値±標準偏差で表されている。(n=8)

CFC-コロニー形成細胞

CFU-mix-幼弱コロニー形成細胞

HPP-CFC-高増殖能維持コロニー形成細胞

【0058】

【実施例5】抗ihh抗体によるihhの阻害

(1) 実施例4で見られたihhストローマによる造血細胞の増幅が、ihhによる直接作用なのか、ストローマ細胞上に発現するヘッジホッグ・レセプターを介した間接作用なのかを検討する目的で、抗体を用いた中和実験を行った。

【0059】

CB (臍帯血) CD34+細胞は、サイトカイン類 (TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) 以下サイトカイン類は同じ濃度を用いた) の存在下で、3日ごとに100 μ g/mlの5E1抗体を添加して、又は添加せずに、ihhストローマ細胞と共に又はストローマ細胞なし (コントロール) で培養された。1x PBSがコントロールの培養皿には添加された。

【0060】

(結果)

図4に結果を示す。増幅された造血細胞(HPS)細胞は、2週間で採取され、分析された。横軸は、抗体5E1の存在の有無を+ (あり)、- (なし) で示す。Aに総細胞数、BにCD34+細胞数、CにCFU-C (Colony-Forming Units in Culture)の細胞数を示す。なお、CD34+細胞数は、フローサイトメトリー分析で計測されたCD34+細胞の割合から算出された。なお、図中の*は、初代ストローマ細胞に対するstudent's t testで $p < 0.05$ である。

【0061】

ストローマ・フリーでの造血細胞の増幅は、中和抗体により、総細胞数およびCD34陽性細胞数ともに約60% ($60.7 \pm 2.6\%$) および約70% ($66.4 \pm 2.8\%$) に抑制された。これは上述のごとくCD34陽性細胞がihhを発現し、そのレセプター分子であるPTCおよびSMOを発現していることから (図1C)、ihhのオートクラインが中和抗体で阻害されるためと考えられる。また、コントロール・ストローマによる造血細胞の増幅は、中和抗体ではほとんど抑制されなかった。このことより、ストローマによる強力な造血支持能は、ihh以外の分泌型あるいは膜蛋白分子が、主要な役割を果たすことが示唆された (図4)。

【0062】

(2) さらに、ihh遺伝子の高発現によるストローマ細胞の造血支持能の増強については、実施例4と同様に培養し、3日ごとに100 μ g/mlの5E1抗体を添加して、又は添加せずに、培養し、14日後に、細胞数を計測した。

【0063】

(結果)

中和抗体で総細胞数およびCD34陽性細胞数ともにそれぞれ約70%および約50%に抑制された。このことよりihhをヒト・ストローマに高発現させることで得られる造血支持能の増強は、ihhの直接作用のみならず間接作用が関与する可能性が示唆された (図5)。

【0064】

【実施例6】

(1) NOD/SCIDマウスへの移植

移植対象として、L Shultz (Jackson Laboratory, bay Harbor, ME, USA) から得られた親マウスから得られた6-10週齢のNOD/SCID-s2m-/-マウスが用いられた。TPO、SCF、FLの存在下で、コントロール・ストローマ細胞又はihh-ストローマ細胞の層とCB CD34+細胞を2週間共培養させた。その後、当該ストローマ細胞層の上方で増殖した造血細胞 (HPCs Hematopoietic cells) を回収した。造血細胞中のストローマ細胞の混入率は、顕微鏡下で0.01%以下であった。ストローマ細胞は、顕微鏡下で、細胞の大きさ及び形態的特徴に基づいて造血細胞から簡単に見分けることができる。

【0065】

(i) CB CD34+ (コントロール・ストローマ細胞又はIhh-ストローマ細胞との共培養する前の細胞)、CB・CD34+細胞を単独で2週間培養 (ストローマなし、サイトカイン類 (TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml)) 添加で培養し得られた細胞

数のこと)、又はCB・CD34+細胞とコントロール・ストローマ細胞若しくはihh-ストローマ細胞との共培養を2週間して増殖された幼弱造血細胞(HPC: primitive hematopoietic progenitor cells)が、400cGyで照射されたマウスに、外側尾静脈を通じて注射した。

【0066】

正常なボランティアからの末梢血単核球細胞で1,500 cGYで照射された 5×10^6 細胞が、アクセサリー細胞として造血細胞と同時に又は単独で移植された。

次に増幅された造血細胞が、骨髓に生着し骨髓再建に寄与し得るか検討した。

【0067】

(結果)

移植後のスキッドマウスにおけるヒト血球のキメリズムは、抗CD45抗体を用いたフローサイトメトリーで決定した。表3に示すごとく、ihh-ストローマ上で2週間増幅した造血細胞は、コントロールのストローマで増幅した場合に比較し、約30倍の生着率を認めた。これまで我々は、ストローマ細胞上のみならずストローマ細胞に潜りこんだ細胞の両者を同時に移植することで、ヒト・ストローマ細胞が造血再建能を維持した細胞(SRC)を支持する可能性を報告してきた。しかしながら臨床応用を考えた場合には不死化ストローマは除くことが望ましく、プラスチック・ディッシュに付着させることで行ってきたが、その完全な除去は困難であった。本研究においてはihhストローマ細胞上に増えた細胞で十分な造血再建が可能であったことから、ストローマ細胞と造血細胞の間にフィルターを入れるなどの操作で比較的容易に、ストローマ細胞の混入を防ぐことが可能であると考えられる。

【0068】

【表3】

表3. 移植後8週間での骨髓及び末梢血への hCD45+ cells の定着

	再構成された細胞を有 するマウス数/移植を受 けたマウス数	移植を受けたマウ スの骨髓中の CD45+ 細胞、 %	移植を受けたマウス の末梢血中のD45+ 細胞、 %
アクセサリ細胞	0/4	ND	ND
非共培養	3/7	0.33±0.47	ND
ストローマ細胞なし	2/4	0.24±0.30	ND
コントロールストローマ細胞	7/7	0.74±0.53	0.13±0.05
lhh導入ストローマ細胞	7/7	10.6±8.20 *	0.60±0.27*

ND は %hCD45 値がカットオフレベルの 0.1%以下であることを示す。値は±標準偏差で示されている。* $P<0.05$, コントロールのストローマグループとの比較において (Mann-Whitney U test)。

【0069】

(2) 移植細胞の定着 (A)

マウスは、移植後8週間又は13週間後に、頸椎脱臼により、屠殺し、骨髓と末梢血単核球を回収した。ヒトの造血細胞の存在は、ALU反復配列をPCRで検出すること、及び抗ヒトCD45特異的抗体を用いて、フローサイトメトリーにより行われた。

【0070】

PCRは、具体的には、プライマー配列としては、5'-CACCTGTAATCCCAGCAGTTT-3' 及び 5'-CGCGATCTCGGCTCACTGCA-3'を用いて行われた。DNA試料は94度で4分間変性し、94度で1分(変性)、55度で45秒(アニーリング)、更に72度で1分(伸長)からなるサイクルを35サイクルし増増幅した。増幅産物は、2.5%アガロースゲル電気泳動上でエチジウム ブロマイド染色で221bpのバンドとして可視化された。

【0071】

(結果)

結果は、図6に示す。

図6(A): アクセサリー細胞だけが移植されたマウスでは、(レーン1, 2, 3)では、反応は見られないが、前共培養されたCB CD 34+細胞が移植されたマウス(レーン4, 5, 6, 7,)では、ヒトのALUの存在が見られた。

なお、数字は、移植マウスの骨髓中でのヒトCD45陽性細胞の割合を示す。

【0072】

図6(B): 抗ヒトCD45抗体を用いた移植後8週間後のマウスの骨髓単核細胞のフローサイトメトリー分析結果が示されている。ihhストローマ細胞と共前培養されたCB CD 34+細胞を移植されたマウスからは、ヒトCD45+細胞が頻繁に見出されている。これは、コントロールのストローマ細胞に比較して、ihhストローマ細胞は、CB CD 34+細胞中の、SRCをより顕著に増幅していることを示している。

【0073】

図6(C): 抗ヒトCD45抗体を用いた移植後13週間後のマウスの骨髓単核細胞のフローサイトメトリー分析結果が示されている。移植期間を延長しても、ihhストローマ細胞と共前培養されたCB CD 34+細胞を移植されたマウスからは、ヒトCD45+細胞を維持していることが分かる。

【0074】

(2) 移植細胞の生着の検討

マウスは、移植後6週間で頸椎脱臼により、屠殺し、骨髓と末梢血単核球を回収した。ヒトの造血細胞の存在は、FITC-抗ヒトCD45コンジュゲートにより染まる細胞を、フローサイトメトリーを用いて検出した。

【0075】

次に、骨髓に生着した細胞が、多分化能を維持しているかフローサイトメトリーで検討した。

【0076】

(結果)

結果を図7A、図7Bに示す。

ihhで増幅させた造血細胞は、既報(Nat Med. 1996;2:1329-1337)のごとくCD11b、CD19、CD38陽性細胞に分化可能であり、分化能はコントロール・ストローマで増幅した際と同様に維持されている可能性が示された。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】 A: インディアン ヘッジホッグ及びそのリセプター分子をコードするmRNAの発現。プライマーは、ihhのC末に特異的なプライマー(表1)が用いられた。レーン1; HUVEC、2; 初代ストローマ細胞、3; hTERTストローマ細胞、4; 臍帯血、5 H₂O B: Shh (ソニックヘッジホッグ) mRNAの発現 表1のShh-1のプライマーセットでRT-PCRされた。レーン1; HUVEC、2; 初代ストローマ細胞、3

; hTERTストローマ細胞、4; 臍帯血、5 胸腺、6; H₂O C: 臍帯血中でのヘッジホッグレセプター分子のmRNAの発現レーン1; 全臍帯血、レーン2; CD34陽性RT陽性細胞、レーン3; CD34陽性RT陰性細胞(RT反応省略したコントロール)

【図2】A: レトロウイルスベクター。LTR ロングターミナルリピート(long terminal repeat)、 Ψ パッケージングシグナル(packaging signal)、hrGFP ヒト化レニラレニフォルミス緑色蛍光タンパク質(humanized Renillareniformis green fluorescent protein)、IRES (internal ribosome entry originated from EMCV viral configuration) コントロールとしては、空のベクターが用いられた。B: Aに示されるベクター両者をストローマ細胞に導入したコントロールストローマ細胞とihhストローマ細胞のメイギムザ染色C: SH2, SH3及びGFPのihh-ストローマ細胞での発現D: ihh-N及びihh-Cに特異的なRT-PCRによるihhのmRNA発現の分析 レーン1はコントロールストローマ細胞、レーン2はihh-ストローマ細胞、レーン3は、H₂Oによる陰性コントロールを示す。E: ヒトストローマ細胞上清中のihh-Nのイムノブロット分析Ihh-Nは抗ヘッジホッグ5E1抗体でラベルされた。レーン1はコントロールのストローマ細胞、レーン2は、ihh-ストローマ細胞を表す。

【図3】(A)コントロールのストローマ細胞又は(B) ihh導入ストローマ細胞で臍帯血由来CD34陽性細胞を2週間増幅した後生じた幼弱造血細胞(primitive HPCs)上の表面抗原の発現(A)hTERTストローマ細胞又は(B) ihhストローマ細胞で臍帯血由来CD34陽性細胞を2週間増幅した後生じた幼弱造血細胞(primitive HPCs)上の表面抗原の発現X軸は、FITC-結合モノクローナル抗体でラベルされたCD34の発現を示す。Y軸は、PE-結合モノクローナル抗体でラベルされたCD3、CD19、GPA、CD11b又はCD41の発現を示す。表面抗原への陽性は、アイソタイプのコントロールモノクローナル抗体との比較で決定した。類似の結果を示す4つの実験の内の代表的な1つの実験からのデータが示されている。

【図4】ストローマ細胞なしの状態での5E1モノクローナル抗体によるihhの阻害実験 増幅された造血細胞(HPCs)は2週間で採取され、分析された。X軸は、阻害する5E1抗体の有無を示す(+は5E1添加群;-は5E1非添加群を表す。) Y軸は細胞数を示す。(A)細胞総数。(B) CD34+細胞数。なお、CD34+細胞数は、フローサイトメトリー分析から得られるCD34+細胞の割合から算出された。(C) コロニー形成細胞数(CFU-C) スチューデントのテストで初代ストローマ細胞に対し*P<0.05

【図5】ihh-ストローマ細胞との共培養での5E1抗体によるihhの阻害実験 増幅された造血細胞(HPCs)は2週間で採取され、分析された。X軸は、細胞増殖期間を示す。なお、+は5E1添加群;-は5E1非添加群を表す。Y軸は細胞数を示す。(A)細胞総数。(B) CD34+細胞数。なお、CD34+細胞数は、フローサイトメトリー分析から得られるCD34+細胞の割合から算出された。(C)コロニー形成細胞数(CFU-C)。(D) HPP-CFC数スチューデントのテストで初代ストローマ細胞に対し*P<0.05

【図6】ヒトゲノムとNOD/SCIDマウス中の%hCD45の分析(A)ヒトALU配列のPCR増幅をしてヒトゲノム中に見出される配列が確認された。レーン1, 2, 3: アクセサレリー細胞が移植されたマウス(3匹)。レーン4, 5, 6, 7, : 前共培養CD34+細胞が移植されたマウス(5匹) %hCD45は移植されたマウスのBM(骨髓)中でのヒトCD45陽性細胞(HPCs)の割合と示す。(B)抗ヒトCD45抗体を用いた、移植8週間後のNOD/SCIDマウスのBM(骨髓)MNC(単核球細胞)のフローサイトメトリー分析の代表的なデータNOD/SCIDマウスは、共培養されていないCD34+細胞(左上)、ストローマ細胞なしで増幅されたHPCs細胞(左下)、コントロールのストローマ細胞(右上)、ihhストローマ細胞(右下)が移植された。培養は2週間行われた。(C)移植13週間後のNOD/SCIDマウスのBM(骨髓)MNC(単核球細胞)のフローサイトメトリー分析の代表的なデータコントロールのストローマ細胞(上)又はihhストローマ細胞(下)で2週間増幅されたヒトCD

45+細胞の生着率(%) Y軸は、PI(ヨウ化プロピジウム)での染色を示す。

【図7A】HPCsのマルチリネージ染色 骨髓に生着した細胞のHPCs多分化能
が維持されているか否かのフローサイトメトリーでの確認コントロール・ストローマ
細胞との共培養系からのHPCsのマルチリネージ染色

【図7B】HPCsのマルチリネージ染色 骨髓に生着した細胞のHPCs多分化能
が維持されているか否かのフローサイトメトリーでの確認ihh-ストローマ細胞との
共培養系からのHPCsのマルチリネージ染色

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Renomedix institute

<120> Method for increasing hematopoietic support ability of immortalized human stromal cells by introducing indian hedgehog gene

<130> P03-0824

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Ala Arg Leu Arg Pro Arg Leu His Phe Cys Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Val Val Pro Ala Ala Trp Gly Cys Gly Pro Gly Arg
 20 25 30

Val Val Gly Ser Arg Arg Arg Pro Pro Arg Lys Leu Val Pro Leu Ala
 35 40 45

Tyr Lys Gln Phe Ser Pro Asn Val Pro Glu Lys Thr Leu Gly Ala Ser
 50 55 60

Gly Arg Tyr Glu Gly Lys Ile Ala Arg Ser Ser Glu Arg Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Leu Thr Pro Asn Tyr Asn Pro Asp Ile Ile Phe Lys Asp Glu Glu Asn
 85 90 95

Thr Gly Ala Asp Arg Leu Met Thr Gln Arg Cys Lys Asp Arg Leu Asn
 100 105 110

Ser Leu Ala Ile Ser Val Met Asn Gln Trp Pro Gly Val Lys Leu Arg
 115 120 125

Val Thr Glu Gly Trp Asp Glu Asp Gly His His Ser Glu Glu Ser Leu
 130 135 140

His Tyr Glu Gly Arg Ala Val Asp Ile Thr Thr Ser Asp Arg Asp Arg
145 150 155 160

Asn Lys Tyr Gly Leu Leu Ala Arg Leu Ala Val Glu Ala Gly Phe Asp
165 170 175

Trp Val Tyr Tyr Glu Ser Lys Ala His Val His Cys Ser Val Lys Ser
180 185 190

Glu His Ser Ala Ala Ala Lys Thr Gly Gly
195 200

<210> 2

<211> 609

<212> DNA

<213> Homo sapiens

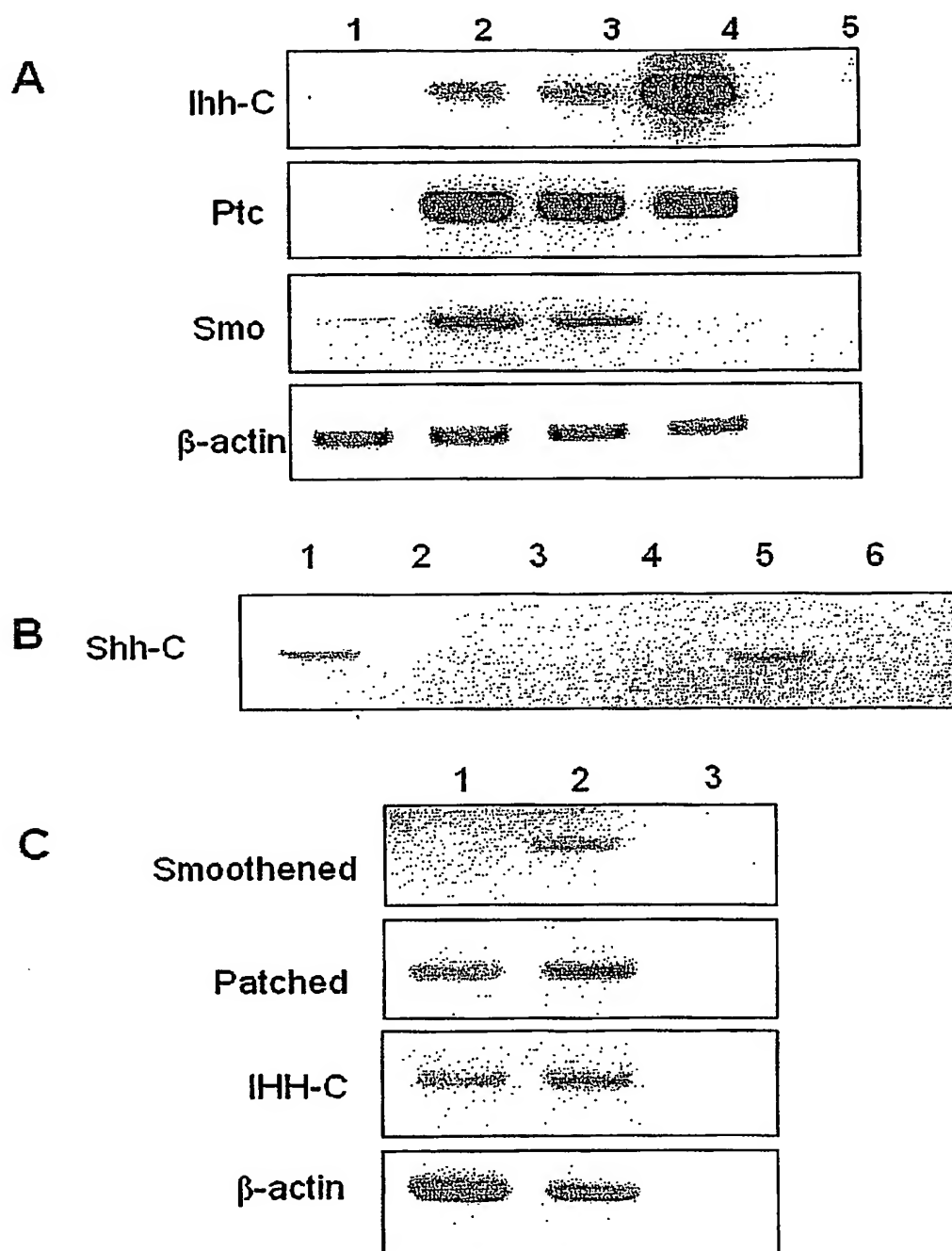
<400> 2

```

atgtctcccg cccggctccg gccccgactg cacttctgcc tggctctgtt gctgctgctg 60
gtggtgccgg cggcatgggg ctgcgggccg ggtcgggtgg tgggcagccg ccggcgaccg 120
ccacgcaaac tcgtgccgct cgcctacaag cagttcagcc ccaatgtgcc cgagaagacc 180
ctgggcgcca gcgagcgcta tgaaggcaag atcgctcgca gctccgagcg cttcaaggag 240
ctcaccacca attacaatcc agacatcatc ttcaaggacg aggagaacac aggcgcccgc 300
cgcctcatga ccagcgctg caaggaccgc ctgaactcgc tggctatctc ggtgatgaac 360
cagtggcccc gtgtgaagct gcgggtgacc gagggctggg acgaggacgg ccaccactca 420
gaggagtccc tgcattatga gggccgcgcg gtggacatca ccacatcaga ccgcgaccgc 480
aataagtatg gactgctggc gcgcttggca gtggaggccg gctttgactg ggtgtattac 540
gagtcaaagg cccacgtgca ttgctccgctc aagtccgagc actcggccgc agccaagacg 600
ggcggctaa                                     609

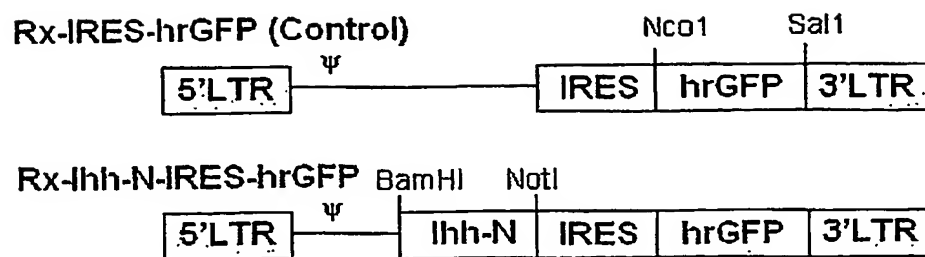
```

【書類名】 図面
【図 1】



【図2】

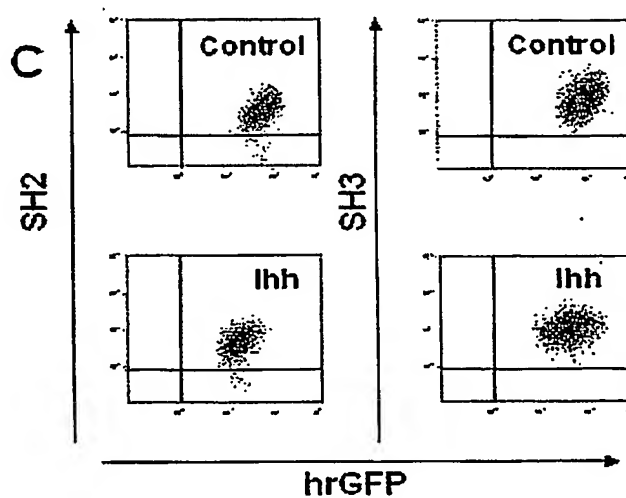
A



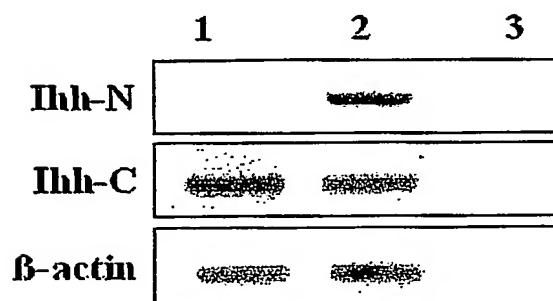
B



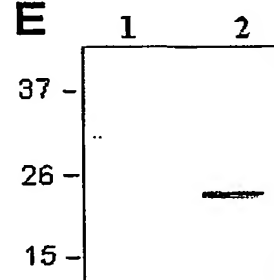
C



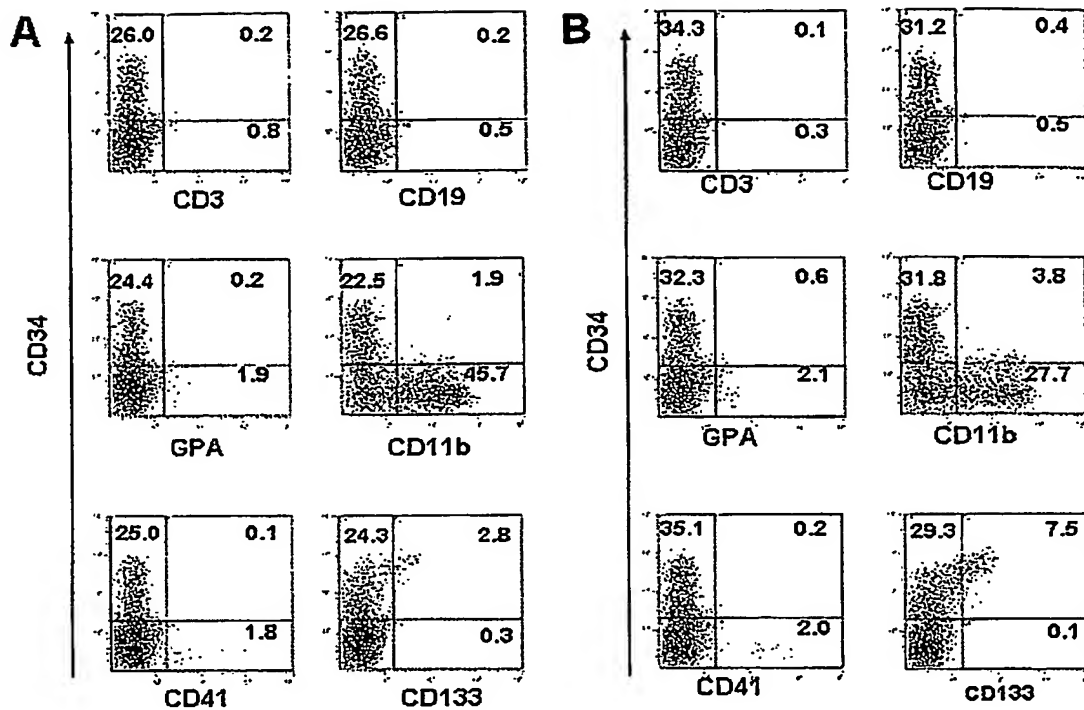
D



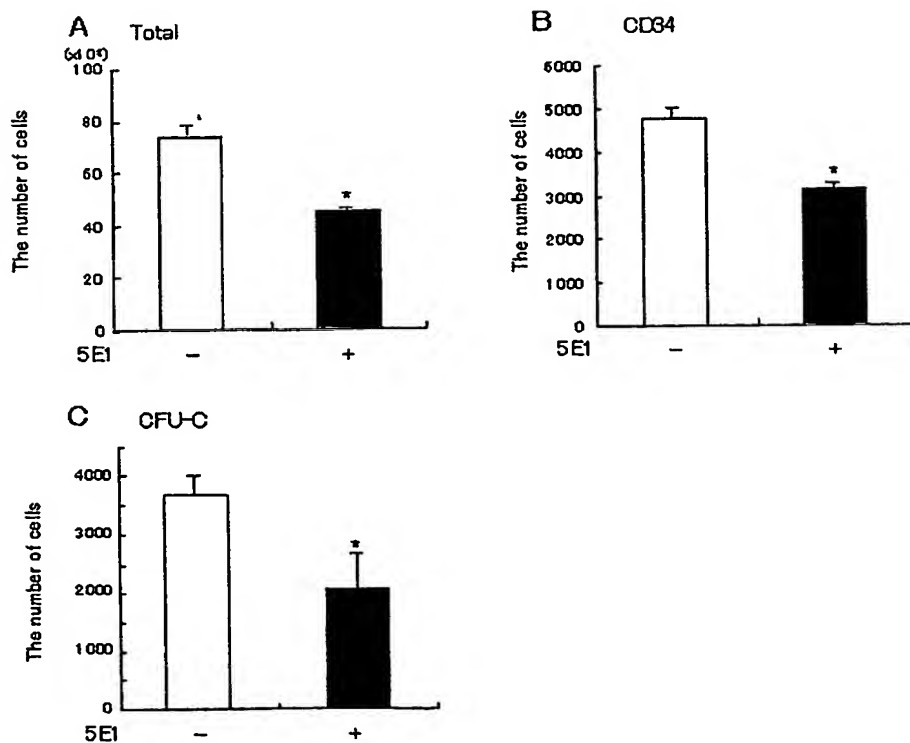
E



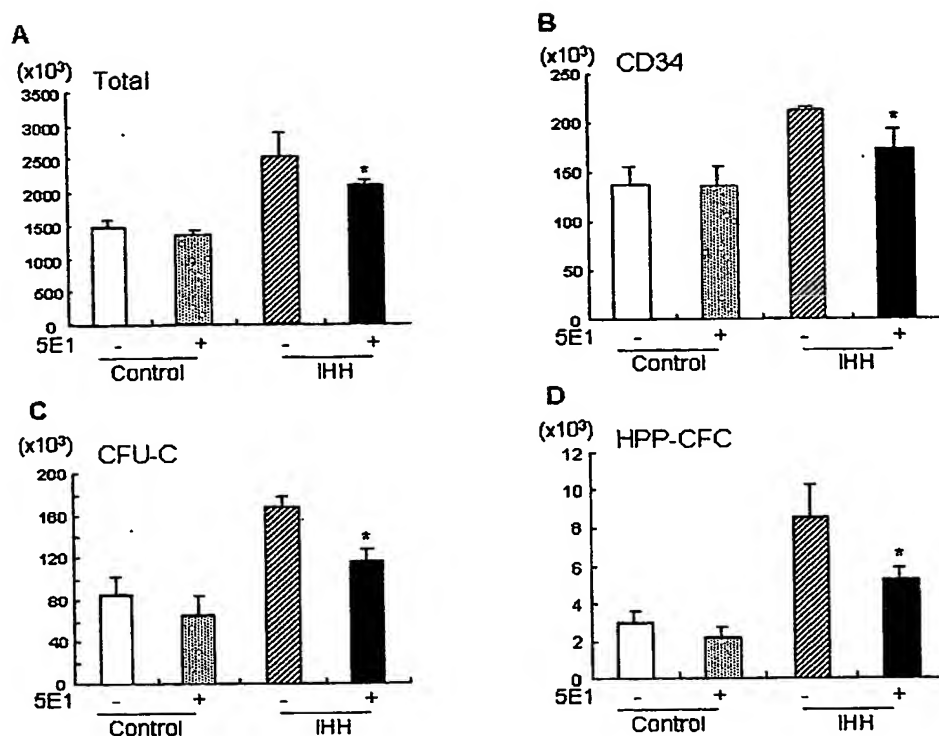
【図3】



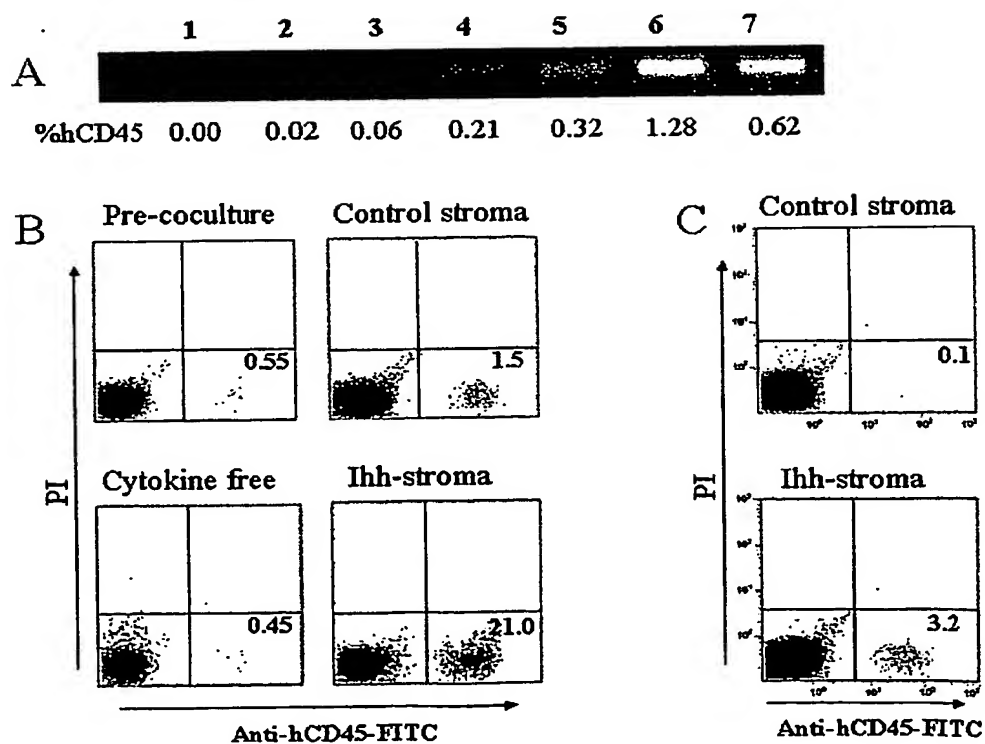
【図4】



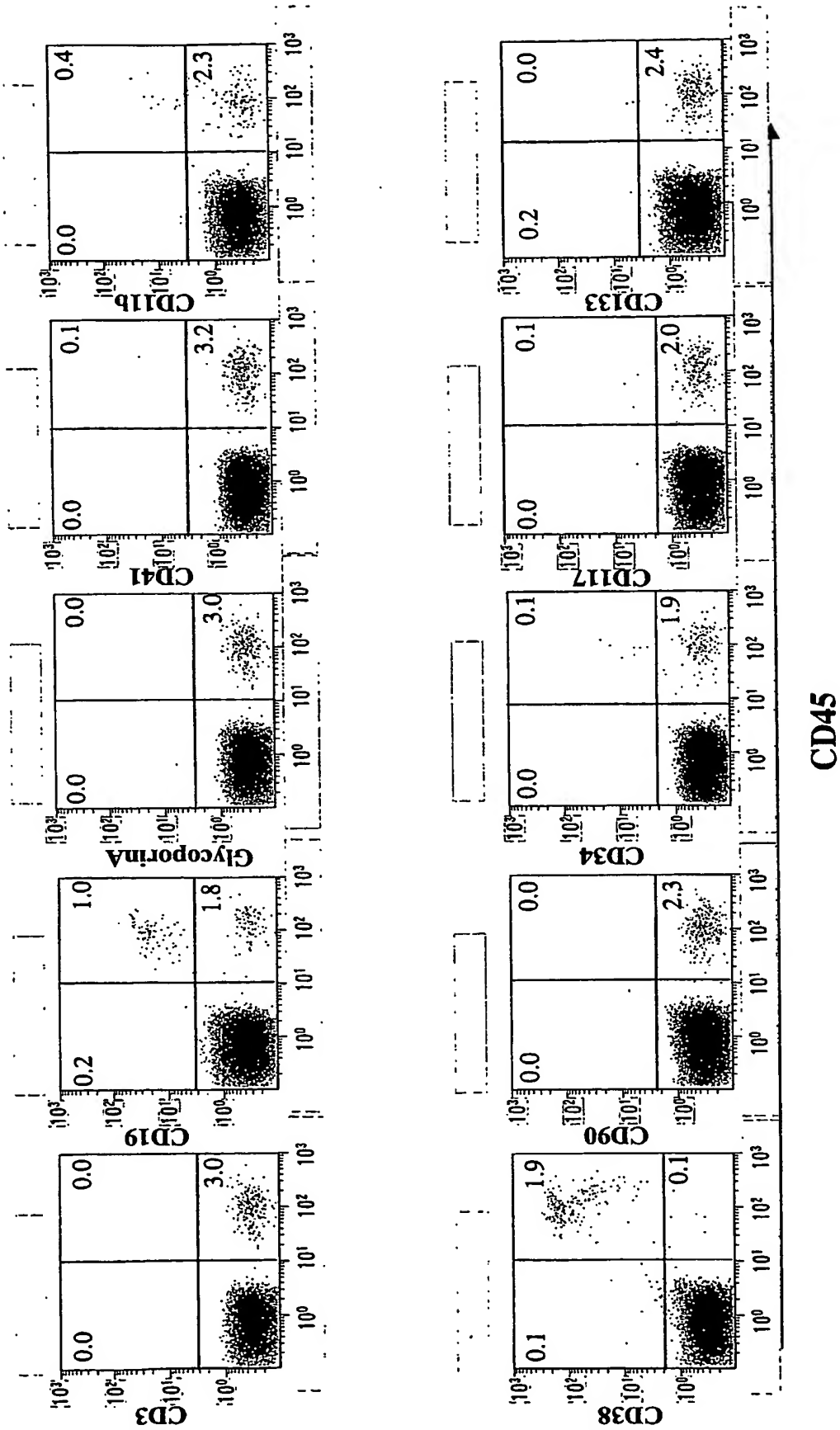
【図 5】



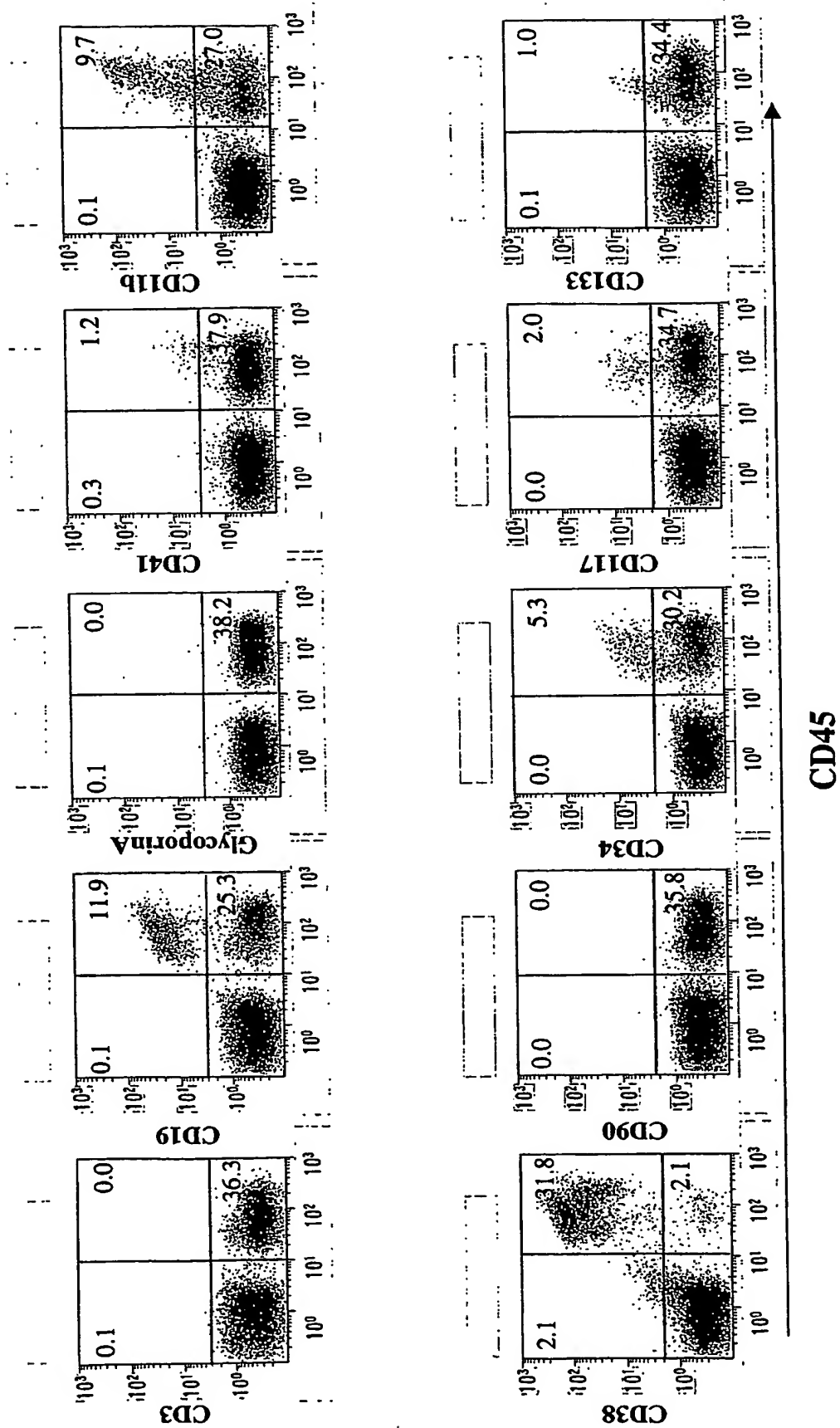
【図 6】



【図 7 A】



【図 7 B】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 hTERTストローマ細胞は、4週以上の長期にわたり造血幹細胞の機能を維持可能であるが、幹細胞の増幅率が比較的低率であるので、造血幹細胞をより増幅する方法を提供すること。

【解決手段】 hTERTストローマ細胞にレトロウイルスベクター用いインディアン ヘッジホッグ（以下ihhとも呼ぶ）遺伝子を導入することで、インディアン ヘッジホッグを過剰発現するhTERTストローマ細胞(ihhストローマ細胞)を樹立し、ihhストローマ細胞を用いることで、造血幹細胞を強力に増幅できた。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 7 3 1 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 5 5 3 9 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 5 月 2 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

北海道札幌市中央区北 1 条東 1 丁目 4 番地 1

氏 名

株式会社レノメディクス研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.